

# VU Research Portal

## Inflammation: a denominating factor in coronary artery disease and venous bypass graft failure

Kupreishvili, K.

2017

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Kupreishvili, K. (2017). *Inflammation: a denominating factor in coronary artery disease and venous bypass graft failure*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## Nederlandse samenvatting

### Atherosclerose

*Atherosclerose* is een aandoening waarbij slagadervernauwing optreedt door het ontstaan van zogenaamde atherosclerotische plaques. Atherosclerotische plaques ontstaan door de opeenhoping van vetachtige stoffen in de intima. Zowel ontstekingscellen als ontstekingsmediatoren spelen een belangrijke rol bij de pathofysiologie van atherosclerose. Atherosclerotische plaques worden onderverdeeld in stabiele en instabiele plaques. Stabiele plaques hebben een relatief beperkte vetophoping en een relatief dikke bedekkende bindweefselkap. Instabiele plaques hebben daarentegen een relatief grote vetophoping, een dunne bedekkende bindweefselkap en/of talrijke ontstekingscellen in de bindweefselkap. De instabiele plaques zijn gevaarlijk omdat ze kunnen resulteren in een plaqueruptuur of plaque-erosie met als mogelijk gevolg thrombusvorming op de plaque. Dit kan resulteren in het afsluiten van het bloedvat. Indien dit optreedt in een kransslagader kan dit resulteren in een acuut hartinfarct. Ontstekingscellen kunnen onder andere door het activeren van matrix metalloproteïnasen een verzwakking van de bindweefselkap induceren. Op deze manier kan de ontsteking dus bijdragen aan het ontstaan van instabiele plaques.

### Atherosclerose van kransslagaders

Aftakkingen van de op het hart liggende kransslagaders gaan de hartspier in en worden dan de zogenaamde intramyocardiale arteriën. In **Hoofdstuk 2** hebben we de accumulatie van een advanced glycation endproduct (AGE), namelijk N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine (CML), onderzocht in de intramyocardiale arteriën. AGE's zijn het product van non-enzymatische versuikering van eiwitten. AGE's ontstaan onder andere bij het ouder worden. Bij mensen met diabetes verloopt dit in een versneld tempo. We vonden nu significant meer accumulatie van CML in de intramyocardiale vaten in hartinfarct patiënten vergeleken met controle patiënten.

In een hartinfarct model in de rat, waarin een acuut myocardiinfarct (AMI) geïnduceerd werd door het afbinden van de linker kransslagader, vonden we die CML deposities in de intramyocardiale vaten niet eerder dan op dag 5 na het hartinfarct. Dit geeft aan dat door de ontstekingsreactie die optreedt na het hartinfarct CML accumulatie wordt geïnduceerd en niet door ischemie / reperfusie

in de eerste dagen na het infarct. Dit werd bevestigd in geïsoleerde endotheelcellen waar ischemie en/of reperfusie niet in CML vorming resulteerde. Dit maakt het onwaarschijnlijk dat bij patiënten met een AMI, CML al vóór het infarct is geaccumuleerd in de intramyocardiale vaten. Bovendien vonden we in hartinfarct patiënten geen verschillen in CML accumulatie in de intramyocardiale bloedvaten tussen geïnfarceerde en niet-geïnfarceerde gebieden. Dit kan verklaard worden op basis van een globaal ischemie effect, dat, naast de ontstekingsreactie, in het hele hart optreedt na een infarct

Zoals boven beschreven is een hartinfarct meestal het gevolg van een plaqueruptuur en/of trombus in de kransslagaders, met name in instabiele plaques. In **Hoofdstuk 3** hebben we de aanwezigheid van mast cellen (MC) in de intima en media van instabiele en stabiele coronaire (kransslagader) laesies onderzocht, op verschillende tijdstippen na het hartinfarct. Het aantal MC in de intima was in beide groepen gelijk, ongeacht de plaquestabiliteit. Er werden evenmin verschillen gevonden in de intima van controle patiënten en patiënten met een acuut (tot 5 dagen) of chronisch (tot 14 dagen) MI. In de media van zowel acute als chronische hartinfarctpatiënten was het aantal MC echter significant hoger dan in de controlegroep.

Een significant verhoogd aantal MC werd ook gevonden in de media van de acute en chronische hartinfarctpatiënten ten opzichte van controle groep bij het evalueren van instabiele en stabiele plaques afzonderlijk. Bij patiënten met een chronisch hartinfarct vonden we een significant groter aantal mediale MC in instabiele laesies vergeleken met stabiele laesies. Bovendien vonden we frequenter instabiele plaques in de kransslagaders van patiënten met chronisch MI in vergelijking met controles en acute MI patiënten. Deze bevindingen suggereren dat de aanwezigheid van MCs in de media van epicardiale kransslagaders kan bijdragen aan het ontstaan van een MI via hun plaque-destabiliserende eigenschappen.

Beide studies, de deposities van CML in de intramyocardiale vaten alsmede de aanwezigheid van MC in de epicardiale kransslagaders onderschrijven derhalve de rol van de ontsteking bij het ontstaan van een hartinfarct op verschillende niveau's.

### **Falen van de veneuze bypass graft**

*De rol van ontstekingsmediatoren.*

Coronary Aortic Bypass Grafting (CABG, bypass operatie) is één van de meest gebruikte therapieën bij de behandeling van vernauwde kransslagaders. Bij zo'n operatie worden zowel arteriële (slagaderlijke) als veneuze (aderlijke) omleidingen (grafts) gebruikt. Een belangrijk nadeel van het gebruik van veneuze grafts is dat de veneuze grafts in vergelijking met arteriële grafts eerder falen. Dit wordt onder andere veroorzaakt door beschadiging van de venewand waardoor versnelde atherosclerose van de vene optreedt op de langere termijn. Hierin speelt het complementsysteem een belangrijke rol. Het is bekend dat bij atherosclerose in het algemeen niet alleen pro-inflammatoir complement geactiveerd is, maar dat er ook endogene complement remmers geactiveerd zijn, zoals bijvoorbeeld C4bp en C1 inhibitor (C1INH). In **Hoofdstuk 4** beschrijven we de rol van C4bp in een ex vivo perfusie model van venen, waarbij menselijke venen met autoloog bloed werden geperfundeerd onder arteriële druk. We vonden een voortdurende toename van C4bp en het pro-inflammatoire C3d in de mediale laag van de vene tot 4 uur perfusie. Interessant is dat de aanwezigheid van C4pb was veel uitgebreider dan C3d, implicerend dat C4pb mogelijk deposities van C3d remmen. Echter na 6 uur perfusie vonden we een sterke afname van C4bp. We vonden ook dat het wegvangen van zuurstofradicalen tijdens de perfusie door het toevoegen van N-acetylcysteine (NAC) aan het perfusaat de aanwezigheid van C4bp in de vene weer significant liet stijgen. Dit suggereert dat oxidatieve stress geïnduceerd door de perfusie, de aanwezigheid van het anti-inflammatoire C4bp in de media remt. Blootstelling van een veneuze graft aan arteriële bloeddruk veroorzaakt derhalve niet alleen ontsteking maar activeert tegelijkertijd ook endogene ontstekingsremmers.

#### *Therapeutisch interventie van veneuze graft falen: C1-inhibitor en PX-18.*

C1-inhibitor (C1INH) is een remmer van de klassieke route van complement, die ook endogeen geproduceerd wordt in vaten. Wij hebben de rol van C1INH nader bestudeerd in veneuze graft falen in **Hoofdstuk 5**. Hiervoor werden veneuze grafts geperfundeerd in een ex vivo opstelling met gehepariniseerd autoloog bloed van dezelfde patiënt waarbij in het ene deel van de perfusies gezuiverd humaan C1INH was toegevoegd. Ook hebben we het perfusie bloed geanalyseerd op de concentratie van C1INH. In de groep geperfundeerd met bloed en C1INH vonden we significant hogere C1INH bloedspiegels en significant meer deposities van C1INH in de venewand. In de controle groep veranderde de concentratie van C1INH in het

bloed niet significant. Opvallend was dat toevoeging van C1INH aan het perfusaat resulteerde in een significante vermindering van verlies van endotheelcellen en deposities van C3d en C4d in de vene, met name in de circulaire laag, vergeleken met venen geperfundeerd zonder C1INH. De toediening van C1INH remde ook de intima verdikking van de veneuze graft in een in vivo model van atherosclerotische muizen op de lange termijn. Dit suggereert derhalve dat C1INH toediening aan patiënten die een CABG ondergaan beschermend zou kunnen werken, ook op de langere termijn.

Eerder is aangetoond dat bij vene graft falen naast ontsteking ook apoptose (het proces van geprogrammeerde celdood) een belangrijke rol speelt. Het ontstekings eiwit secretair type II fosfolipase A2 (sPLA2-IIA) speelt een belangrijke rol in atherosclerose van arteriën. sPLA2-IIA is niet alleen pro-inflammatoir maar induceert ook celdood onafhankelijk van een ontstekingsreactie. PX-18 (2-N, N-bis (oleoyloxyethyl) amino-1-ethaansulfonzuur) is een sPLA2-IIA remmer met celbeschermende eigenschappen. We onderzochten eerder de rol van PX18 in het acute myocardinfarct en vonden dat PX18 niet alleen het acute fase eiwit sPLA2-IIA remt, maar ook apoptose van hartspiercellen voorkomt onafhankelijk van sPLA2-IIA. We hebben in **Hoofdstuk 6** onderzocht wat het effect is van PX18 in het ex vivo perfusie model van humane venen

We hebben aangetoond dat toevoeging van PX18 aan het perfusie bloed een duidelijke vermindering van perfusie geïnduceerd verlies van endotheelcellen gaf in vergelijking met venen die geperfundeerd waren zonder PX18. Dit ging gepaard met een duidelijke afname van sPLA2-IIA in de media van de veneuze graft die geperfundeerd waren. We hebben vervolgens onderzocht of PX-18 endotheelcellen van veneuze grafts kon beschermen tegen apoptotische celdood. Hiervoor hebben we human umbilical vein endothelial cells (HUVEC's) blootgesteld aan mechanische stretch gedurende 24 uur in aan-of afwezigheid van PX-18. We vonden dat PX18 significant de stress-geïnduceerde caspase-3 activatie (een marker van apoptose) in HUVEC's in vitro verminderde, onafhankelijk van sPLA2-IIA. Deze resultaten suggereren dat PX18 het endotheel van veneuze graft beschermt tegen perfusie geïnduceerde afwijkingen die voor een deel verklaard kunnen worden door de remming van apoptose van endotheelcellen, ook onafhankelijk van sPLA2-IIA.

Deze studies in venen suggereren derhalve dat anti-inflammatoire therapie, b.v. C1-remmer en / of PX18 een gunstig effect kunnen hebben in patiënten die een bypass operatie ondergaan met veneuze grafts.

*Vein graft falen: de rol van de infectie.*

Het is bekend dat Chlamydia pneumoniae (Cp) infectie betrokken is bij het proces van atherosclerose van arteriën. Zo veroorzaakt Cp infectie van humane endotheelcellen een transendotheliale migratie van ontstekingscellen in vitro en activeert het de secretie van ontstekingsmediatoren. Zo is aangetoond dat menselijke macrofagen geïnfecteerd met Cp in verhoogde mate inflammatoire cytokines afgeven. Ook is Cp DNA aangetoond in vene grafts in 12% van alle patiënten die een bypass operatie ondergaan en werd dit in 38% van de patiënten gevonden die uiteindelijk vene graft falen hadden. In **Hoofdstuk 7** hebben we onderzocht wat het effect is van perfusie van menselijke venen op Cp positiviteit. In niet-geperfundeerde venen was Cp aanwezig in macrofagen in de adventitia van VSM grafts in 91% van alle patiënten (aangetoond middels een RR-402-antilichaam). Het aantal positieve cellen verschilde duidelijk tussen de verschillende patiënten. In de media van niet-geperfundeerde venen vonden we Cp macrofagen zowel in de circulaire laag in 64% als in de longitudinale gladde spierlaag in 23%. Er werd geen positiviteit van Cp in de intima gevonden. Perfusie resulteerde vervolgens in een significante toename van Cp positieve cellen in de circulaire laag van de media van 64 % naar 91%, maar niet in de longitudinale laag of de intima, terwijl in de adventitia een stijging van 91% tot 100% werd gevonden. Aangezien Cp DNA in deze venen middels PCR niet werd gedetecteerd, suggereert dit dat antigenen in plaats van levend Cp persisteren in de aderwand. Dit suggereert dat antibiotische therapie tegen Cp derhalve niet zinvol zou zijn in veneuze bypass operaties.